

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE UNA MISMA DOSIS DE RADIACIÓN GAMMA DEL RADIUM Y DE RAYOS X, DESDE EL PUNTO DE VISTA DE SU ACCIÓN BIOLÓGICA

Dr. JOSÉ R. GUIX MELCIOR

PREÁMBULO

LA extensión que en la práctica clínica diaria va teniendo el uso de las sustancias radioactivas, tanto naturales, como los isotopos producidos artificialmente, llevan ligados los primordiales e importantísimos problemas inherentes a su dosificación; pues no en vano dijo el célebre físico Lord KELVIN que sólo podía ser perfectamente conocido y estudiado lo susceptible de ser medido.

Este problema de las medidas, en la física aplicada en la medicina, se complica enormemente, pues el médico no trata solamente de calcular la energía total que se desprende de un tubo radífero o de una ampolla de rayos X, cosa relativamente fácil y desde hace tiempo completamente solucionada; sino que el radioterapeuta busca con las medidas cuantitativas de la radiación el establecer una relación entre el efecto biológico y la energía absorbida por los tejidos, que será la única que producirá acción sobre ellos, ya que es una ley fundamental de que sólo obrará la energía absorbida.

A este efecto, esta energía absorbida, tomándola desde el punto de vista de "cantidad capaz de producir un efecto" fué denominada hace ya años por GREVE como "energía eficaz" y la práctica médica usual hizo que se la denominara por analogía con otros medicamentos con el nombre de "dosis".

La "dosis" representa, pues, una cierta cantidad de energía absorbida por un material absorbente cualquiera, y el estudio de esta absorción que da lugar a complejos fenómenos intraatómicos (radiación característica, radiación difusa con cambio de longitud de onda, efecto Compton) con los que se origina la absorción por difusión, absorción por fluorescencia, con el consiguiente efecto fotoeléctrico de fluorescencia; es un problema completamente conocido por la física moderna.

Las medidas cuantitativas que nos llevan en radiología al conocimiento de la dosis, recibirá el nombre de dosimetría.

Esta dosimetría ha ido evolucionando para las substancias radioactivas naturales, o más concretamente para la radiación gamma del radium (que es, dejando aparte las radiaciones producidas por los isotopos radioactivos logrados artificialmente estos últimos años, la única usada en la actualidad, pues los rayos B son muy poco empleados y su dosificación nos llevaría por derroteros distintos a los que nos ocuparemos en este trabajo); al principio, lejos de pensarse en que se llegaría como etapa final a una unificación de medida con los rayos X, etapa que quizás algún físico o médico llegara a concebir como una meta quimérica, se utilizaron una serie de procedimientos de dosimetría más o menos groseros e inexactos, pero que en aquel momento cumplieron su cometido, por el gran desarrollo que ha experimentado la física en este segundo cuarto de siglo. ha hecho posible el llegar, físicamente hablando, al ideal de unificar en una sola unidad la medida de la radiación X y gamma del radium.

Acto seguido de cumplida esta etapa, en la cual la labor fué desempeñada exclusivamente por los físicos, llegaba la hora de aplicar estos conocimientos en medicina y biología y se planteaban una serie de problemas de índole clínico biológico, aun no del todo resueltos en nuestros días. Por muy exactas que fueran las correspondencias entre una misma dosis de radiación ionizante X y gamma del radium y aunque ambas fueron expresadas en una misma unidad dosimétrica, que es la unidad *r*; los efectos terapéuticos en la práctica clínica y más concretamente la reacción eritema de la piel "test" muy usado en radiología ya desde los primeros tiempos por la facilidad de su empleo en dosimetría biológica, no correspondía a una igualdad de dosis física de ambas radiaciones, o sea una misma dosis no nos daba la misma reacción eritematosa. En el curso de este trabajo exponremos los motivos por los cuales el "test" de la dosis eritema de la piel no puede ser usado para medidas biológicas de unas radiaciones cualitativamente tan diferentes como son la X y la gamma del radium.

Pero había otro material biológico en el cual las experiencias de numerosos autores indicaban que las diferencias cualitativas de la radiación no tenían efecto y sólo obraban las diferencias cuantitativas; este material son los huevos de la *Drosophila Melenogaster*, uno de los pocos que podría permitir el efectuar este estudio comparativo entre la acción biológica de estas dos radiaciones ionizantes unificadas cuantitativamente y no obstante, tan dispares cualitativamente.

Por no haberse trabajado en nuestro país con anterioridad con este material biológico en experiencias radiobiológicas, procuramos enumerar prolijamente las dificultades que hemos tenido que vencer, por si pueden

servir de una pequeña ayuda a trabajos de investigaciones posteriores. Por nuestra parte, tal como señalamos en las conclusiones, deseamos que investigadores más capacitados que nosotros prosigan por este camino para lograr aclarar, si es posible, la tan debatida "especificidad de acción" para una longitud de onda determinada que al igual que la tan conocida "intensidad óptima para un efecto biológico o terapéutico determinado" (*), podría ser la clave de nuevos y esperanzadores tratamientos.

PARTE FÍSICA

Al iniciarse los estudios sobre la aplicación clínica de los cuerpos radioactivos naturales, se pusieron en práctica una serie de métodos de dosificación para poder tener un punto de comparación entre los diferentes resultados que se iban logrando.

Cuando el preparado radioactivo con que se iba a trabajar era estable, para evaluar la cantidad de radiación emergente en un período de tiempo fijo bastan indicando el filtro, señalar el producto del peso de la substancia radioactiva empleada por el tiempo que dura la aplicación; de esta manera tan sencilla se indica la cantidad de radiación suministrada.

De esta concepción nació el "miligramo hora", que es la cantidad de radiación emitida durante una hora por 1 mgr. de radio en equilibrio.

El peso de la substancia radioactiva se determina por la medida de la radiación que emite, por ser la radiación gamma emitida por una preparación de radium en equilibrio, proporcional a su contenido en radium elemento.

De este modo será suficiente para conocer el contenido de Ra de una preparación incógnita el medir la ionización que produce en el aire con un electómetro y compararla con la ionización producida por una cantidad conocida de Ra.

Como unidades "patrón" existen en distintas Universidades cantidades conocidas de Ra y cuyo contenido ha sido determinado muy meticulosamente. Asimismo en el Museo Internacional de Pesos y Medidas de Sevres existe el depositado en 1912 por Madame Curie.

El radón constituye el primer producto de la desintegración del Ra. Si tenemos un tubo de Ra herméticamente cerrado se van produciendo a partir de este elemento los que le van siguiendo en la familia del uranio-radio y transcurrido un tiempo aproximadamente igual a diez veces la vida media del radón se produce el equilibrio radioactivo, entre la can-

(*) Véase "Las primeras exonicaciones conseguidas con la radioterapia", R. Campos y J. R. Guix Melcior. (Congreso de Dermatología de Lisboa. Mayo 1950.)

tividad de radón que se va formando a partir del Ra y el que se transforma en RaA, RaB, RaC.

A partir de este momento en que se ha producido el equilibrio radioactivo, la cantidad de Rn será constante y, por lo tanto, indicando la cantidad de Rn o emanación presente en un preparado de radio en equilibrio indicamos el contenido de Ra del preparado.

El Curie es la unidad internacional empleada para medir la cantidad de Rn que contiene una preparación de Ra. Se define como la cantidad de emanación en equilibrio con 1 gr. de Ra correspondiendo a 1'78, 40 átomos de Rn, pesando 6'52, 10 gr. Por ser esta unidad muy grande en la práctica se utiliza la milésima parte o milicurie.

Puede deducirse que en la práctica es perfectamente igual el utilizar como medida el miligramo hora o el milicurie hora, siempre que las radiaciones provengan de un preparado en equilibrio.

La emisión por parte de un preparado de radium de radiaciones gamma utilizadas en terapia corre a cargo del radium C y por ser los productos intermedios RaA, RaB de una vida media brevísima, se alcanza con gran rapidez el equilibrio radioactivo con este último.

Será obvio, por lo tanto, que al indicar la cantidad de Rn que se desintegra durante un cierto período, se indica también la cantidad que se va desintegrando de radio C y por consiguiente la cantidad de radiación emitida por una partícula radioactiva.

Partiendo de este concepto, una nueva unidad fué definida y ampliamente usada en medicina después de haber sido propuesta en 1914 por REGAUD y DOBIERNE. Expresando la dosificación del radium en milicuries destruidos por centímetro cuadrado cuando se trataba de superficies, o por centímetro cúbico al tratarse de aplicaciones intersticiales en volumen.

Para convertir los miligramos hora en milicuries destruidos, solamente hace falta recordar que en una célula que contenga un gramo de Ra en equilibrio se forman y se destruyen todas las horas 7'55 milicuries, lo que quiere decir que 1.000 miligramos hora es igual a 7'55 milicuries destruidos.

La distancia del tubo radífero al punto que va a ser irradiado y el espesor y la naturaleza del filtro usado también ha de expresarse exactamente para que tengan valor comparativo las dosificaciones hechas con los métodos anteriormente citados.

Pero la medida de la radiación gamma a nivel de los tejidos no era suficiente con estos métodos y se hacía necesario el empleo de nuevas unidades. PROUST y MALLET propusieron una unidad llamada D, en honor de DOMINICI y que se define de la manera siguiente: la unidad D es la

cantidad de radiación recibida por la cámara de ionización del ionómetro Mallet situado a 2 cm. de un tubo de 10 miligramos de Ra, el filtro es de 2 mm. de Pt y la duración es de 10 horas.

Otras unidades han sido sugeridas, tales como el radio, el radar, el "Eve", junto con muchas unidades biológicas, pero ninguna de ellas han sido aceptadas prácticamente. El interés por el "Eve" fué renovado hace quince años. Este tema se había ya tratado en antiguos trabajos publicados por EVE en el *Filosofical Magazine* desde 1905 a 1914.

En estos trabajos se determinaba el número de pares de iones producidos, durante un segundo, por los rayos gamma que emanaban de un gramo de radio situado en el interior de un tubo y a la distancia de un centímetro, el volumen de aire en el que se medía la ionización era de un centímetro cúbico. Por medio de trabajos muy laboriosos se llegó a la determinación de la constante conocida desde entonces con el nombre "constante de Eve" y que nos dice que a cero grados de temperatura, 760 mm. de presión y en las condiciones anteriormente expresadas se nos producen 4.26 por 10 pares de iones.

De esta manera, mediante la aplicación de esta constante, el número de iones que producía un miligramo hora de Ra podía ser calculado muy fácilmente y conociendo la carga elemental de un ion se podía revertir con una simple operación en unidades electroestáticas.

En 1928, en el Congreso de Radiología de Estocolmo se dió un paso definitivo para la medida de los rayos X, al adoptarse la *r* internacional. En este primer tiempo fué definida como la cantidad de radiación X que al irradiar un centímetro cúbico de aire a la temperatura de 18 grados y a la presión de 760 mm. de Hg. al utilizar todos los electrones formados en el aire, eliminando el efecto pared produce una conductibilidad tal que la cantidad de electricidad medida en corriente de saturación es igual a una unidad electroestática. En esta definición exclusiva para la radiación X no podía englobarse como unidad de medida de la radiación gamma del radium.

Pero al unificarse en el Congreso Internacional de Radiología de 1937 la medida de ambas radiaciones el *r* quedaba definido como la cantidad de radiación X o gamma del radium cuya emisión corpuscular asociada por 0.001 gramos de aire, producía en el aire iones que transporten una unidad electroestática de cantidad de electricidad de uno y otro signo.

Seguidamente, numerosos investigadores trataron de determinar la llamada "intensidad de dosis específica con rayos gamma del radium", o sea la intensidad suministrada por un tubo de radium puntiforme de un miligramo de carga, filtrado con 0.5 mm. de Pt y a un centímetro de dis-

tancia focal, en condiciones muy análogas a las que anteriormente hemos hecho referencia al hablar de la determinación del "Eve".

El problema físico es mucho más complicado al tratarse de la radiación gamma que en los rayos X, por ser el recorrido de los fotoelectrones secundarios extraordinariamente largo y también por el hecho de que los rayos X emergían de un anticátodo que a partir de cierta distancia focal podía ser considerado sin cometer un error grosero como puntiforme, mientras que en el radium las condiciones de trabajo usuales se verifican a distancias focales pequeñas y con focos que generalmente tienen una longitud de 16 mm.; no obstante, hemos señalado que esta última dificultad para la determinación de la "intensidad de dosis específica para los rayos gamma del radium", ha sido sobrepasada utilizando focos puntiformes, con lo que el problema se simplificó grandemente.

Al principio, los trabajos eran muy numerosos, pero extremadamente dispares.

Tanto es así que para GLASSER esta intensidad sería de 2 r por hora. Mientras que para WHIT sería de 15 r por hora. SIEBERT, en el Acta Radiológica de 1934, en unos trabajos comprobados por BENNER, da una intensidad de 7,5 r por hora. Y los trabajos de JAEGER, del General Bureau de Standards, ofrecían análogos resultados.

En 1931, MAYNEORD con mediciones calorimétricas y de absorción por el aire calculaba 8,7 r.

HAYE, en 1937, demostró que debido al gran alcance de los electrones secundarios las dimensiones de la cámara de aire necesitaban ser mucho mayores para que existiera el equilibrio necesario, con una cámara a propósito halló una cifra de 8 r por hora.

TAYLOR, operando con una cámara de paredes delgadas suspendida en el centro de un gran salón encontraba 7,8 r por hora.

FRIEDRICH busca otro procedimiento esperando reducir el tamaño de la cámara de aire sometiénola a una presión de 10 atmósferas y de esta forma obtiene la cifra de 8,1 r por hora.

En la actualidad el problema parece estar bastante resuelto al menos en límites de errores pequeños, que ha hecho posible el integrar a la práctica clínica diaria el uso del r gamma.

La intensidad específica hallada por PATERSON y PARKER con medidas efectuadas con aparatos y métodos mucho más precisos dan una intensidad de 8,4 r por hora. Sentada esta base estos mismos autores han creado un método práctico para el cálculo en r de las técnicas de curieterapia. Este cálculo sólo es posible mediante el empleo cuidadoso de las tablas que nos dan los citados autores para revertir los miligramos hora en r. Son precisas una serie de condiciones de disposición de los tubos

para que se cumplan las características de una buena uniformidad. Estas características difíciles de guardar en algunos casos no solamente se refieren a la disposición de los tubos en la técnica llamada "gammaterapia a pequeña distancia", sino también a la disposición de las agujas para la gammaterapia intersticial. También la proporcionalidad de carga entre los diferentes aparatos radíferos es meticulosamente expuesta.

Este tema ha sido tratado también por otros autores, entre ellos QUIMBY, que pone a nuestro alcance reglas precisas para la conversión de miligramos hora en r.

Sentados los antecedentes precedentes veremos que el objeto de nuestro trabajo se refiere a aprovechar los trabajos físicos del Manchester System el buscar que equivalencia biológica pueda existir entre estas dos radiaciones de tan diferente longitud de onda como son los rayos X producidos a 180 Kv. en tensión constante y la radiación gamma del radium.

Dejándonos sugestionar por la idea de que al acabar estos estudios en diciembre de 1949 no teníamos noticias sobre datos bibliográficos de intentos de dosificación biológica comparativa con material adecuado, entre estas dos radiaciones medidas con la misma unidad.

BIOLOGIA

Los efectos radiológicos de las radiaciones llamaron la atención desde los primeros días a los clínicos y biólogos. Los estudios clásicos que datan ya de 1903, de BOHN, BERGONIE y TRIBONDEAU; DOMINICI, 1904, y PRICE-JONES y MOTRAM, 1914, contribuyen a poner los cimientos de la radiobiología. Al mismo tiempo, llega a tener un concepto claro de lo que será clave del tratamiento del cáncer por radium, esto es, la noción de radiosensibilidad, que queda definida: Como la relativa susceptibilidad de las células vivas a cierta cantidad de energía ionizada. Más tarde llegan los trabajos de REGAUD, LACASSAGNE, EVING, PACKARD y los estudios de la irradiación de cultivos de tejidos iniciados por STRANGEWAIS y tan brillantemente continuados por CANTI, SPEAR, LEA y colaboradores de los laboratorios de Cambridge. Todos estos avances en la biología de las radiaciones estaban subordinados a un exacto uso clínico y para ello era necesaria una medida de la dosis en los tejidos; el paso definitivo como hemos establecido anteriormente fué dado al corregir la dosis roentgen de tal manera que nos sirviera para medir los rayos gamma del radium, pero esto ha producido otros problemas, ya que la diferencia a pesar de ello que existe entre las dos, es obvia para el clínico.

Diremos con EDITH QUIMBY "en este período la exactitud ha substituido al caos y tenemos una certeza no soñada hace pocos años".

Ya hemos señalado que a pesar de haber unificado la manera de medir las radiaciones roentgen y gamma del radium los resultados biológicos y clínicos son algo diferentes; es la intención de nuestro trabajo el poner en evidencia y analizar las causas de esta disparidad de resultados. Asimismo hemos podido encontrar un material biológico en el cual los efectos biológicos no están subordinados al cambio de la longitud de onda y, por lo tanto, lo hemos considerado un material precioso para utilizarlo en la comparación biológica de las medidas físicas del radium y los rayos roentgen.

No pasa lo mismo con el otro test escogido que ha sido la dosis biológica sobre piel, aquí era ya perfectamente conocido que encontraríamos grandes diferencias con diferentes longitudes de onda; en efecto, si la acción biológica es producida por la parte de energía que se absorbe en el volumen cuyo efecto biológico estamos considerando, ya era conocido que un roentgen, según LAURINTZEN del Institute of Technologie de California, había encontrado que a 100 Kv. una r representa una energía total de 3.500 ergios por centímetro cuadrado, mientras que a 400 Kv. una r representa solamente 2.800 ergios por centímetro cuadrado. Si dejamos que dos rayos monocromáticos atraviesen la piel de un paciente encontraremos que un 0,8 % de la energía total es absorbida en el primer milímetro para el haz de 100 Kv. Mientras que solamente un 0,5 % de la energía total es absorbida para 400 Kv. La razón y la causa de esto no es debido solamente al mayor poder de penetración de las radiaciones más duras, sino también a la radiación difusa que sigue la dirección contraria al haz incidente y que es mayor en el caso de 100 Kv. Así, en el caso de 100 Kv., el 0,8 % de 3.500 representaba 8 ergios absorbidos en el primer milímetro, mientras que en 400 Kv. solamente 14 ergios, 0,5 % de 2.800, son absorbidos.

Si la reacción depende solamente de la energía total absorbida en la piel nos encontraremos que para obtener la dosis eritema será necesaria una energía a 100 Kv., igual a 1.750.000 ergios por centímetro cuadrado, resultante de multiplicar 3.500 ergios, que era la energía de un roentgen, por los 500 roentgen necesarios para obtener la reacción, mientras que trabajando a 500 Kv. para obtener una reacción similar son necesarios 1.000 r y como una r representa una energía total de 2.800 ergios por centímetro cuadrado, la energía representada por 1.000 r precisas para obtener la reacción, ha de ser de 2.800.000 ergios por centímetro cuadrado.

La radiación gamma del radium representa un haz de rayos roentgen producidos a 1.500 Kv., por lo tanto ya es previsible que las dosis en r gamma necesarias para obtener el eritema serán muy superiores a las establecidas para con rayos roentgen; de modo que hoy un eritema roentgen

se calcula obtenido con un promedio de 550 r y se ha calculado que para obtener el mismo eritema radium se necesitan 1.000 r.

PARTE EXPERIMENTAL

Experiencias con huevos de *Drosophila Melanogaster*

La *drosophila melanogaster*, mosca de la fruta, mosca del vinagre, pertenece al género de insectos dípteros braquíceros de la familia de los muscoides, grupo de los acalípteros, caracterizados por tener las antenas muy cortas, con la arista largamente pignada, a veces pectinada, los palpos pequeños y aplicados a la proboscide y el tórax grueso y abovedado; el abdomen de cinco anillos y las alas más largas que el abdomen, siendo la celda discoidal confundida con la nasal anterior y la basal posterior nula.

Los huevos de la *drosophila melanogaster* podemos calificarlos como un buen material o al menos, y esto se ha demostrado por la Comisión Investigadora de la Energía Atómica en su campo biológico, como uno de los mejores para los trabajos radiobiológicos "in vivo".

El gran número de huevos que podemos obtener en un tiempo relativamente corto y con un número relativamente bajo de insectos, junto con la particularidad de ser fácilmente comprobables las mutaciones experimentadas por el insecto adulto, hicieron que TIMOFEEF-RESSOUSKY escogiera este material como "test" para las mutaciones provocadas por los rayos X y es con este material que este sabio ruso pudo llegar a la conclusión de que la calidad de la radiación no tiene efecto sobre la tasa de las mutaciones de los huevos de *drosophila*, que solamente dependerán de la dosis recibida y, por lo tanto, el efecto biológico es independiente de la calidad de la radiación.

Otros autores, entre ellos PACKARD, han trabajado también intensamente con este material, reconociendo la exactitud de los efectos letales producidos sobre los huevos por una dosis fija de radiación ionizante y la independencia del efecto biológico, con la longitud de onda.

Resumiremos en los siete conceptos siguientes las razones fundamentales por las que hemos escogido este material biológico para el trabajo que deseamos efectuar.

I. Los resultados obtenidos año por año por numerosos autores que, desde PACKARD y siguiendo por YUNGLING y LAGENDORFF, han trabajado con este material nos confirman que desde una escala de radiaciones, comprendiendo desde los rayos Grenz hasta 700 Kv. no había cambio por efecto de la longitud de onda.

II. Este material, al contrario de la reacción eritema de la piel, no

está influenciado por el factor tiempo-intensidad, lo que simplifica mucho las comparaciones.

III. Hemos seguido una serie de cuidados técnicos para que el material empleado sea igualmente sensible para obtener valores comparables entre ellos. Segunda condición de HOLTHUSEN para dosimetría biológica. Para cumplir mejor esta condición hemos operado a pesar de las dificultades que se nos han presentado con un gran número de individuos.

IV. El material biológico escogido está constituido por unidades tan pequeñas que las modificaciones debidas a la disminución de la intensidad del haz para absorción son despreciables; además, este material se ha podido siempre exponer a la irradiación formando una sola capa y con un radio tan pequeño que la radiación ha sido uniforme, teniendo en cuenta la ley del coseno para todos los huevos.

V. Asimismo las medidas físicas que han sido utilizadas en este material se acercan mucho a las utilizadas en las dosis terapéuticas comunes con lo que cumplíamos el apartado sexto de HOLTHUSEN.

VI. Aunque el material no es independiente de los fenómenos exteriores (temperatura, humedad, etc.), la comparación se ha efectuado de tal forma que los dos "test" sometidos a la irradiación han sido situados en análogas características.

VII. El efecto producido por los rayos X y gamma es completamente claro para que sea discernible sin ambigüedad. Esta que es la condición fundamental para toda investigación biológica ha sido bien cumplida, ya que siempre hemos buscado la dosis letal para el 50 % de huevos irradiados.

Las dificultades principales que hemos encontrado para trabajar con este material las iremos exponiendo más adelante, pero avanzaremos que nos ha sido particularmente difícil conseguir que las drosophilas pusieran los huevos en el lugar que habíamos de irradiar, ya que teníamos que tener especial cuidado en que estos huevos tuvieran una edad máxima de una hora, a fin de que presentaran una radiosensibilidad uniforme.

Obtención de huevos por cultivos de Drosophilas

Al principio de nuestras experiencias procedimos con una cepa de drosophilas procedente de la Universidad de París.

La dificultad primera que se nos presentó fué el obtener un gran número de moscas, para poder recoger un suficiente número de huevos en un corto período de tiempo; para ello, cuando empezamos a tener las primeras larvas las fuimos separando en potes de cristal de 8 cm. de alto por 3 cm. de diámetro.

El alimento consistía en plátano con agar.

Pronto empezaron a desarrollarse las larvas, pero ninguna de ellas llegó al estado adulto, debido a que se formaba una capa de hongos que de una manera mecánica impedía la alimentación de las drosophilas.

Después de varios ensayos creemos que el cultivo que da mejor resultado para las drosophilas es una mezcla de cocimiento de harina de maíz con agar-agar y una pequeña cantidad de Nipalgina; este producto sirve para evitar durante bastante tiempo el desarrollo de hongos.

Hemos ido efectuando pruebas sobre la temperatura óptima para la obtención de un gran número de larvas; la relación guardada entre la temperatura y el desarrollo de éstas nos han parecido muy evidente. Pero no puede sobrepasarse a nuestro parecer una temperatura de 25° - 27°, porque entonces sobreviene una rápida fermentación de los alimentos de las moscas que hace que no se desarrollen satisfactoriamente las larvas.

Otra dificultad que se nos ha presentado, debido a las condiciones higrométricas de Barcelona, es que en algunas ocasiones, debido a la alta humedad reinante, el vapor de agua se ha precipitado en el cristal de los frascos, produciéndonos la pérdida de bastantes cepas. También los parásitos de las drosophilas han producido la pérdida de otros cultivos, quizá porque en alguna ocasión habíamos recogido moscas que se habían escapado y al volverlas a introducir en las cepas causaron su ruina.

Recogida de huevos

La técnica para la recolección de huevos la hemos ido variando en tres etapas fundamentales en un primer estadio y por utilizar para las cepas los frascos mencionados anteriormente de pequeño tamaño. Situábamos un papel de color oscuro en el fondo de un frasco vacío y pasábamos las drosophilas desde los frascos de cultivo a éste.

Este procedimiento es completamente inaceptable por las siguientes condiciones:

I. Dificultad en conseguir que las drosophilas pongan los huevos en el lugar destinado para la recolección, ya que muchas veces lo hacen en las paredes de cristal del frasco.

II. Al faltarles a los huevos un soporte húmedo no se desarrollan, secándose al poco tiempo.

III. En los cambios de frascos se pierde un número considerable de moscas. Por todos estos motivos vimos que para seguir adelante la experiencia teníamos que cambiar completamente el procedimiento de la recolección.

El segundo procedimiento empleado fué imitado del empleado por

OTTO GLASSER de la Fundación Clínica de Cleveland. Este procedimiento consiste en emplear frascos de cultivo mucho mayores y en posición horizontal, con una abertura en una de las paredes laterales del frasco, una abertura circular de 4 cm. de diámetro y que ofrece una manera de introducir un portaobjetos en el interior del cultivo. Una gelatina compuesta de plátano y agar-agar emulsionado y filtrado expuesta sobre una cápsula de Petri hasta que se solidifica, debiendo tener un espesor de 4 mm. Una vez se ha logrado esto puede cortarse en trozos rectangulares de unos 400 mm. cuadrados que son colocados encima del portaobjetos e introducidos mediante unas pinzas que en su extremidad perforan el tapón que obtura la entrada del cultivo en el interior de la colonia.

De esta forma ya nos fué posible recoger un número de huevos que se hacía mayor a medida que al pasar el tiempo la comida de las moscas era menos fresca y, por lo tanto, éstas tenían mas apetencia para alimentarse y poner sus huevos en la substancia fresca introducida con el portaobjetos. El sitio de preferencia para la puesta de los huevos es generalmente los bordes de la gelatina, lo que dificulta bastante el recuento de éstos.

El tercer procedimiento empleado, creo que el más absolutamente original, es el que nos ha dado mejor resultado y recomendamos para estas experiencias, consiste en aprovechar la gran sensibilidad fototropa de las moscas y su apetencia por la levadura. De esta forma, en un frasco en el interior del cual existe un portaobjetos con la mezcla de plátano, agar-agar, más unas gotas de levadura, era puesto en comunicación con el frasco cultivo que se dejaba completamente sin luz, iluminando fuertemente con una lámpara eléctrica el pequeño frasco, de esta forma sumábamos las dos atracciones de la luz y de las substancias en fermentación (levadura para las mismas y al ser menor el espacio que las contenía el número de huevos logrado es mucho mayor, suponemos también el influjo de la luz sobre la mayor puesta de huevos.

Los cultivos de moscas han de cambiarse cada 15 ó 20 días, ya que en caso contrario el desarrollo decrece en proporción geométrica.

Técnica que hemos usado para la irradiación

En unos cuantos ensayos preliminares hemos ido comprobando la gran diferencia de sensibilidad según que los huevos procedieran de media hora, una hora o dos horas después de su puesta; para obtener un número suficiente nos hemos visto obligados a trabajar con huevos procedentes de un cultivo que los ha ido poniendo durante una hora, por lo que se trata de un grupo muy heterogéneo. Pero como al fin y al cabo lo que

tratábamos de estudiar eran medidas comparativas era necesario obtener tres grupos similares dentro de su heterogeneidad y producidos por una sola colonia durante un período de dos horas, para ello poníamos en el portaobjetos tres franjas de las pastillas de plátano y agar-agar, buscando el porcentaje a través de un número bastante considerable de irradiaciones.

El recuento de los huevos tiene que practicarse después de la irradiación, que en todos los casos la hemos efectuado inmediatamente después de sacar los huevos del cultivo. Este recuento requiere cierta práctica y por haber cometido errores groseros de técnica en las seis experiencias primeras no las consignamos en el protocolo de experimentación.

Después de hecho el recuento ponemos los huevos dentro de un frasco de cultivo sin tocarlos del portaobjetos, así los dejamos durante 48 horas con una humedad lo más alta posible, que hemos obtenido humedeciendo el algodón con agua cada 4 ó 5 horas; al mismo tiempo este algodón sirve para que no se introduzcan en el frasco insectos desde el exterior. Hemos procurado que la temperatura sea siempre la misma durante este período de incubación, habiendo trabajado a una temperatura de 27°. En las primeras experiencias observamos que a baja temperatura los huevos pueden tardar hasta 4 ó 5 días a convertirse en larvas.

Desde la experiencia núm. 7 hasta la núm. 11, el procedimiento de recuento de huevos y el período de incubación señalado anteriormente, así como los detalles técnicos para que no quedase ninguna duda sobre el porcentaje de los efectos letales de la irradiación ya nos permitía señalar algún resultado. No obstante, efectuábamos solamente la irradiación con rayos roentgen y no establecíamos todavía la comparación con la radiación gamma del radium.

Una de las dificultades que se nos presentaron en esta parte de la experiencia fué debida a que en el control no sometido a la radiación también observábamos un número bastante importante de huevos no desarrollados; después de revisar cuidadosamente la técnica de la incubación, llegamos a la conclusión de que podía ser debido a la existencia de mutaciones letales en estos huevos y fuimos seleccionando, de las diferentes cepas, las que mayor porcentaje de huevos fecundos daban; a pesar de ello, estas cepas siempre han tenido un porcentaje de huevos que, a pesar de no haber sido irradiados, no se han desarrollado; este porcentaje ha sido en algún caso bastante considerable y por creer que la repartición según todas las probabilidades es la misma entre los huevos situados en las dos franjas de plátano agar-agar del portaobjetos, hemos restado de los huevos no desarrollados por la irradiación, el porcentaje correspondiente a los hue-

vos no desarrollados en el control por otras causas ajenas a la irradiación. Por este camino podemos decir que las cantidades dadas de efectos letales, solamente podrán ser atribuidas al efecto biológico de la irradiación.

La medida física de las radiaciones la hemos efectuado, para que los rayos roentgen, con una cámara de ionización de las de tipo corriente; el voltaje empleado ha sido de 180 Kv. y a pesar de que las comunicaciones precedentes de diversos autores nos decían que no existía una relación entre el efecto biológico y el factor tiempo, hemos logrado que las dos irradiaciones fueran exactamente en el mismo tiempo. Para los rayos roentgen se logró haciendo trabajar el tubo a muy baja intensidad y con un filtraje de 1 mm. de Cu más 2 mm. de Al y a una distancia de 50 cm. del anticátodo, siendo la intensidad de la irradiación de 3 r por minuto. La dosis fué medida sobre un campo de 6 por 8 cm. y la difusión se logró con un bloque de parafina de 15 cm. de espesor.

Para el radium siguiendo las instrucciones de PARKER y PATTERSON del Manchester Sistem y adoptando la forma que ellos han encontrado más exacta para la uniforme distribución de la radiación ha sido adoptada la forma de cuadrilátero para la disposición de los tubos. De esta forma sobre pasta columbia de 5 mm. de distancia focal que sumados a 1 mm. del portaobjetos y 4 mm. de la placa plátano agar-agar en cuya superficie están situados los huevos, se llegaba al espesor de 1 cm. total de distancia focal. Esta medida por conocer la importancia extraordinaria que puede tener sobre el resultado de la investigación, ha sido en todas las experiencias muy cuidadosamente vigilada y medida con un pie de rey. Los tubos que forman el cuadrilátero tienen una carga cada uno de 13 con 13 mg. de radium elemento filtrado de 1 mm. de Pt. el cuadrilátero tiene 2 cm. por lado, lo que se logra sobreponiendo entre sí 2 mm. los extremos de los tubos cuya longitud total es de 22 mm. Según las tablas de PATTERSON y PARKER, la intensidad en r logradas con esta disposición es de 200 r en una hora, más 6, lo que representa una intensidad minuto de 3,1 r. La difusión fué lograda con un bloque de parafina de 20 cm. de espesor.

PROTOCOLO

Experiencias con huevos de *Drosophila*

Experiencia núm. 7. — Número total de huevos, 185. El porcentaje de huevos no desarrollados en el control no irradiado fué de un 12 %.

La irradiación se ha efectuado con las características señaladas y solamente con radiaciones roentgen. La dosis suministrada fué de 190 r.

El porcentaje de huevos no desarrollados entre los irradiados es de 53 %, el 12 % de huevos no desarrollados por causas ajenas a la irradiación nos da el resultado de que 190 r producen la muerte del 41 % de los huevos.

Experiencia núm. 8. — Número total de huevos, 215. El porcentaje de huevos no desarrollados en el control no irradiado fué de un 18 %.

Por ser tan alto este porcentaje fué abandonada esta cepa y no seguida la experimentación.

Experiencia núm. 9. — Número total de huevos, 301. El porcentaje de huevos no desarrollados en el control no irradiado fué de un 9 %. La irradiación se ha practicado solamente con radiaciones roengen. La dosis suministrada es de 195 r.

El porcentaje de huevos no desarrollados entre los irradiados es de un 54 %. Efectuando las operaciones consecuentes obtenemos el resultado de que 195 r producen la muerte del 45 % de los huevos.

Experiencia núm. 10. — Número total de huevos, 218. El porcentaje de huevos no desarrollados en el control no irradiado fué de un 10 %.

La irradiación se efectuaba solamente con rayos roentgen. La dosis suministrada es de 195 r.

El porcentaje de huevos no desarrollados entre los irradiados es de un 56 %. Efectuando las operaciones consecuentes obtenemos el resultado de que 195 r producen la muerte del 46 % de los huevos.

Experiencia núm. 11. — Número total de huevos, 278. El porcentaje de huevos no desarrollados en el control no irradiado fué de un 14 %.

La irradiación se ha practicado solamente con rayos roentgen. La dosis suministrada es de 210 r.

El porcentaje de huevos no desarrollados entre los irradiados es de un 65 %. Efectuando las operaciones consecuentes obtenemos el resultado de que 195 r producen la muerte del 51 % de los huevos.

* * *

A partir de esta experiencia en el porta objetos se colocaron tres franjas de la gelatina formada por el plátano agar-agar y levadura.

En una de ellas se practicó la irradiación con rayos roentgen, en la otra con rayos gamma y la otra fué mantenida como control, para conocer el porcentaje de huevos no desarrollados por causas ajenas a la irradiación.

Experiencia núm. 12. — Número total de huevos, 349. El porcentaje de huevos no desarrollados en el control no irradiado fué de un 8 %.

La irradiación se ha practicado con radiación roentgen a una intensidad de 3,2 r por minuto hasta una dosis de 200 r.

Otra porción de huevos ha sido irradiada con radiación gamma del radium, mediante el dispositivo descrito en la parte general. La irradiación ha durado para el radium una hora 6 con un total de 200 r y una intensidad de 3 r por minuto.

El porcentaje de huevos no desarrollados entre los irradiados con rayos gamma del radium ha sido de un 48 % que deducido el 8 % de mortalidad espontánea nos da un 40 % de huevos muertos por 200 r gamma.

El porcentaje de huevos no desarrollados entre los irradiados con rayos roentgen ha sido de un 54 % que deducido el 8 % de mortalidad espontánea del control nos da un efecto letal para el 46 % de los huevos.

Experiencia núm. 13. — Número total de huevos, 189. El porcentaje de huevos no desarrollados en el control no irradiado fué de un 10 %.

La irradiación se ha practicado con características análogas a la interior, tanto para rayos gamma como para rayos roentgen.

En la franja irradiada con rayos roentgen hasta una dosis de 210 r encontramos un 58 % de huevos no desarrollados pasadas las 48 horas de incubación. Deducido el 10 % obtenemos un 48 % de efectos letales.

La dosis en r gamma fué también de 10 r encontrándose después de la incubación un 51 % de huevos no desarrollados. Deduciéndose el 41 % de efectos letales.

Experiencia núm. 14. — Número total de huevos, 196. Huevos no desarrollados en el control, 9 %. Huevos no desarrollados con la irradiación roentgen 210 r, 58 %. Deducido el 9 % nos queda un 49 %.

La dosis en r gamma fué de 220 r suministrada en una hora 13 con un porcentaje de huevos muertos de 41 %, de este resultado se ha deducido el porcentaje de mortalidad natural.

Experiencia núm. 15. — Número total de huevos, 201. Huevos no desarrollados en el control, 13 %.

Huevos muertos con la irradiación roentgen (deducido ya el porcentaje del control), 210 r — 46 %.

Huevos muertos con el radium (deducido el porcentaje de mortalidad espontánea), 230 r — 47 %.

Experiencia núm. 16. — Número total de huevos, 209. Huevos no desarrollados en el control, 11 %.

Huevos muertos con la irradiación roentgen (deducida la mortalidad espontánea), 210 r — 51 %.

Huevos muertos con el radium (deducida la mortalidad espontánea), 240 r gamma 53 %.

Experiencia núm. 17. — Número total de huevos, 148. Huevos no desarrollados en el control, 15 %.

Huevos muertos con la radiación roentgen (deducida la mortalidad espontánea), 52 % para 210 r.

Huevos muertos con el radium (deducida la mortalidad espontánea), 240 r—50 %.

Experiencia núm. 18. — Número total de huevos, 127. Huevos no desarrollados en el control, 9 %.

Huevos muertos con la radiación roentgen (deducida la mortalidad espontánea), 210 r—50 %.

Huevos muertos con el radium (deducida la mortalidad espontánea), 240 r gamma 48 %.

Experiencia núm. 19. — Número total de huevos, 111. Huevos no desarrollados en el control, 10 %.

Huevos muertos con la radiación roentgen (deducida la mortalidad espontánea), 210 r—48 %.

Huevos muertos con el radium (deducida la mortalidad espontánea), 240 r gamma 53 %.

Experiencia núm. 20. — Número total de huevos, 99. Huevos no desarrollados en el control, 14 %.

Huevos muertos con la radiación roentgen (deducida la mortalidad espontánea), 51 % — 210 r.

Huevos muertos con el radium (deducida la mortalidad espontánea), 240 r gamma 54 %.

Terminados estos trabajos experimentales en el mes de diciembre de 1949 y habiendo sido presentados al Profesor doctor Vicente Carulla para que nos emitiera sus opiniones acerca de los resultados obtenidos. En el *American Journal of Roentgenology* correspondiente al mes de febrero de 1950, apareció un artículo titulado *Radiological additivity of various ionizing radiation*. Cita 26. Los autores emplean este material biológico por considerarlo el más apropiado para comparar la acción de estos corpúsculos y radiaciones sobre los seres vivos. Fué para nosotros un motivo de satisfacción el comprobar que dichos autores llegaban también a la observación de que son precisas 240 r gamma para producir el efecto deseado, o sea la muerte de la mitad de los huevos expuestos a la radiación.

Al mismo tiempo la similitud de estos resultados nos hacen confiar

en la exactitud de la medición de la dosis de radium al emplear el Manchester Systema de PARKER y PATTERSON.

"TEST" SOBRE PIEL

La dosimetría cutánea es ya muy antigua y los primeros radiólogos habían buscado el tomar las reacciones de la piel como "test" dosimétrico que les permitiera una seguridad en sus tratamientos, que no podían asegurarse los rudimentarios métodos dosimétricos primitivos.

SEITZ y WINTZ, de la Clínica de Erlangen, ensayaron de servirse de esta reacción cutánea como base real para la irradiación terapéutica, designándola con las letras Hed (Hanterytemdosis), pero en este momento no poseían aparatos que les permitiesen efectuar medidas físicas comparativas correctas. Y es por este motivo que autores del prestigio de SALOMÓN emitieron opiniones despectivas respecto a la bondad de este "test".

Los estudios completos sobre las reacciones cutáneas efectuadas posteriormente por DUFFY, VOKE, MIERCHER, MATTICK y otros, han permitido constatar la gran complejidad de los caracteres de este "test" que puede dividirse en varios grados, de esta manera se llegó al concepto de UMBRAL del eritema (Ted) difícil de definir y de apreciar y que se ha descrito como "aquella dosis capaz de producir una reacción visible en el 80 % de los "test" sometidos a la irradiación, cuatro semanas después de la irradiación, mientras que no aparece ninguna reacción en el 20 % restante". Las reacciones de la piel a dosis mayores de radiación se caracteriza por un enrojecimiento vivo, que aparece 15 días o tres semanas después de la sesión y que desaparece dejando un aumento marcado de la pigmentación. Los estadios siguientes se caracterizan por enrojecimiento más intenso de la piel seguido de descamación constituyendo la llamada "epidermitis seca" y la tan interesante para el cancerólogo "epidermitis húmeda" en la cual la reacción eritematosa va seguida de la formación de flictemas llegándose a reparar sin dejar cicatrices, pero que nos marca el límite superior de la dosis de tolerancia de la piel. Más allá se producirían lesiones del dermis de carácter irreversible y no obstante es necesario en cancerología llegar en muchos casos a suministrar al paciente una dosis física que produzca la epidermitis húmeda para conseguir curar el tumor.

Anteriormente hemos citado los argumentos para rechazar las reacciones biológicas de la piel como prueba de comparación entre dos radiaciones ionizantes de tan diferente longitud de onda.

Por otra parte esta reacción biológica ofrecía también dificultades de otra índole siendo la más importante de ellas el factor tiempo que ya a

partir de los trabajos de QUIMBY y McCOM se habían valorado convenientemente en los trabajos sobre la dosis eritema, demostrando que en la búsqueda de dicha dosis serían erróneos todos los resultados que no llegasen a tener en cuenta el tiempo en que duraba la exposición de la piel a la radiación. En el caso de las drosophilas, según hemos expresado en el apartado correspondiente, debido a que la dosis era pequeña para obtener el efecto biológico apetecido, pudimos llegar a una muy semejante intensidad con las dos radiaciones; pero cuando lo que buscábamos hacía preciso llegar a dosis totales de 4.000 a 6.000 r era imposible someter a los enfermos a radiaciones con rayos roentgen de tan pequeña intensidad que para suministrar dicha dosis hubiéramos tenido que practicar sesiones de 200 horas.

Por lo tanto, los resultados conseguidos y expresados a continuación, sólo tienden a contribuir a facilitar posteriores trabajos con r gamma del radium, habiendo de adoptarlos con las consiguientes reservas. Dejamos a otros investigadores que vayan precisando en la práctica radiológica diaria las diferentes reacciones de la piel a una dosis precisa del radium dosificado con r gamma, atendiendo a la diferencia de edades, a la diferente reacción según la localización topográfica de la piel y según la intensidad.

Las diferencias sobre las dosis precisas son muy evidentes, cuando se trata de obtener epidermitis húmeda con gammaterapia intersticial o a pequeña distancia; pero creemos que no es debido de manera alguna a error de dosificación, sino al menor filtro utilizado en la gammaterapia intersticial, junto al efecto caústico de los rayos B secundarios del Platino que por su intensa acción biológica darían un mayor resultado en los tejidos en la gammaterapia intersticial.

De esta manera podrá verse que la epidermitis húmeda lograda con 4.000 r en gammaterapia intersticial, ha hecho preciso llegar a una dosis de 5.000 a 6.000 r para obtenerla con gammaterapia a pequeña distancia.

Hacemos constar nuestro más profundo agradecimiento a nuestro querido maestro el Profesor doctor VICENTE CARULLA por ser todos los enfermos irradiados procedentes del servicio de Terapéutica Física adjunto a su Cátedra. Y por su valiosa dirección, sin la cual no nos hubiera sido posible efectuar este trabajo.

CONCLUSIONES

I. Aunque la llamada "intensidad específica" del radium ofrezca pequeñas variaciones según los autores, se demuestra que el método de

PARKER y PATTERSON es lo suficiente preciso para dar resultados análogos a los obtenidos por otros medios de medida.

II. Es absolutamente necesario utilizar como material para las experiencias los huevos de *drosophila* por subordinarse a todas las condiciones necesarias en la práctica y señaladas ya por HOLTHUSEN. Creyendo que los otros materiales como virus, células en cultivo, bacterias, huevos de ascaris, etc. Serán elementos valiosos para experiencias radiobiológicas de otro género; pero al tratarse de medidas biológicas de radiaciones, las ventajas de los huevos de *drosophila* son muy categóricas.

III. De las anteriores experiencias se deduce que para obtener en los huevos de *drosophila*, el efecto biológico señalado por PACKARD, o sea la muerte del 50 % de los huevos expuestos a la radiación, es preciso suministrar una dosis de 240 r gamma. Mientras que con rayos X engendrados a un potencial de 180 Kv. es suficiente 210 roentgenios.

IV. Esta diferencia entre la dosis física necesaria para obtener este mismo efecto biológico, podría inducir a un estudio más profundo que se refiriera a la cuestión tan debatida de la "especificidad de acción" para una longitud de onda determinada, siendo en este caso y para este efecto concreto, más activas las radiaciones roentgen que las gamma y en la relación expresada.

V. En la práctica clínica queda demostrado que para obtener una epidermitis húmeda con la radiación gamma y utilizando como medida la unidad r, hace falta una dosis de 5.000 a 6.000 r en gammaterapia a pequeña distancia y de 4.000 a 4.500 en gammaterapia intersticial.

BIBLIOGRAFIA

- SIMPSON, F. E.: Radium dosage and technique in carcinoma of the tongue. *Am. J. Roentgenol. Rad. Therapy*, 1935, 34, 63-68.
- SUTTON, R. L. y SUTTON, R. L. (Jr.): *Diseases of the skin*. Tenth edition C. V. Mosby Co. St. Louis, 1939.
- WILSON, C. W. y CADE, S.: Some direct measurements of the gamma ray dose delivered to malignant lesions of the tongue by interstitial irradiation. *Brit. J. Radiol.*, 1938, II, 599-610.
- JAMES A. CORSCADEN, M. D., S. B. GUSBERG, N. D. y CHARLOTTE P. DONLAN, M. D.: Precision dosage in interstitial irradiation of the cervix uteri. *Am. J. Roentgenol. Rad. Therapy*, 1948, 60.
- NOLAN, J. F. y QUIMBY, E. H.: Dosage calculation for various combinations of parametrial needles and intracervical tandems. *Radiology*, 1943, 40, 391-402.
- QUIMBY, E. H.: Dosage table for linear radium sources. *Radiology*, 1944, 43, 572-577.
- JAMES F. NOLAN, M. D. y WILLIAM NATOLI, M. D.: Dosage measurements for various methods of intrauterine radium applications in cancer of the endometrium. *Am. J. Roentgenol. Rad. Therapy*, 1948, 59, 786-795.
- CORSCADEN, J. A.: Evaluation of radiation in treatment of carcinoma in the corpus uteri. *J. A. M. A.*, 1944, 126, 1.134-1.136.
- HERNBERGER, C., HOFFMAN, J. G. y NOLAN, J. F.: Films method of dosimetry for gamma radiation. Unreported study.
- HOWES, W. E.: Tissue dose estimation in combined roentgen and radium therapy for carcinoma of uterine cervix. *New York State J. Med.*, 1944, 44, 1.563-1.568.

- LUCAS, C.: Calculation of the dosage in radium treatment of carcinoma of the cervix. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1936, 26, 477-479.
- SANDLER, B.: Investigation into dosage delivered by certain techniques in radiation therapy of carcinoma of the cervix. *Brit. J. Radiol*, 1938, II, 523-636.
- WOLF, D. S.: Radiumdosage for linear sources. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1943, 50, 400-405.
- QUIMBY, E. H.: The specification of dosage in radium therapy. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1941, 45, 1-17.
- QUIMBY, E. H. y MC. COMB W. S.: Further studies of the rate of recovery of human skin from the effects of roentgen or gamma rays irradiation. *Radiology*, 1927, 29, 305.
- PATTERSON, R. y PARKER, H. M.: Dosage system for gamma ray therapy. *Brit. J. Radiol*, 1934, 7, 592.
- QUIMBY, E. H., MARINELLI, C. D. y BLADY SECONDARY filters in radium therapy. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1939, 41, 804.
- PATTERSON, R. Q.: Dosage system for interstitial radium therapy. Part I. Clinical aspects *Brit. J. Radiol*, 1938, 313.
- PARKER, H. M.: Dosage system for interstitial radium therapy. Part II. Physical aspects. *Brit. J. Radiol*, 1938, II, 313.
- E. H. QUIMBY, FAILLA, G., MARINELLI, D. y ROSE, J. E.: The relative effects produced by 200 kv. roentgen rays, 700 kv. roentgen rays and gamma rays. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1933, 29, 293.
- WOODDARD, H. O., QUIMBY, E. H. y DOWNES, H. B.: The relative effects produced by 200 kv. roentgen rays, 700 kv. roentgen rays and gamma rays. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1933.
- GLICKSMANN'S Preliminary observation on the quantitative examination of human biopsy material taken from irradiated carcinomata. *Brit. J. Radiol*, 1941, 14, 187-198.
- EWING, J.: Early experiences in radiation therapy. *Am. J. Rad. Roentgenol*, 1934, 31, 153-163.
- JOLLES, B.: Effective dosage levels in interstitial radium therapy. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1948, 60, 745.
- MARTIN, Ch., MARTIN, J.: Treatment of advanced cancer involving the ear. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1948, 60, 750.
- RAYMOND, E., DIRKLE, F. H.: Radiobiological additivity of various ionizing radiation. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1950.
- QUIMBY, E.: Skin erythema dose with combination of two types of radiation. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1927, 17.
- PACKARD: The biological effects of short radiations. *New Biol.*, 1931, 6, 253-280.
- GLASSER, O.: La determinación física de la dosis del radium. *Cleveland Clinic Foundation*.
- STANFORD, CADE: The achievement of radium in the fight against cancer. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1948, 60, 731.
- FAILLA, C. y HENSHAW, P. S.: The relative biological effectiveness of X rays and gamma rays. *Radiology*, 1931, 17.
- PACKARD, C.: The biological measurement of scattered radiation. *J. Cancer Research*, 1929, 13, 373-382.
- CATTELL, W.: The effects of X rays on the growth of Wheat seedlings. *Science*, 1931.
- WILSON: Radium Therapy; Its physical aspects. *Champan and Hall Ltd., London*, 1945.
- HENSHAW P. S., HENSHAW, P.T. y FRANCIS, O. S.: The relative effects produced by 200 kv. roentgen rays and gamma rays. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 1933, 29.
- STAPLETON, G. E. y ZIRKLE, R. E.: Comparative effectiveness and additivity of fission neutrons, gamma rays and beta rays as drosophila eggs. *Manhattan project report*, 120, 1946.
- PORTMEN, V. V. y GLASSER, O.: Essential requirements in radiations physics. *Annual conference of teachers of radiology of the american College of radiology* in 1947.
- KEMP, A. W., INST F. P.: An improved dose calculator for linear radioactive sources. *Acta Radiologica*, 1950, 35, 17.
- BURROWS, M. T., JOSTAD, L. H. y ERATS, E. G.: The chemical and biological changes induced by X rays in body tissues. *Radiologi*, t. 2, p. 370, 1928.
- CALO, A.: Cultures the tissues dans le plasma des animaux irradiés. *Strahlentherapi*, 1932.
- CANTI, R. G. y DONALSON: The effect of radium on mitosis in vitro. *Proc. of Roy. Soc.*, 102, 413, 1926.

- CANTI, R. G. y SPEAR, P. G.: The effect of gamma radiation on cell division in tissue culture in vitro. *Proc. Roy. Soc.*, 102, 92, 1927.
- DALOUS, E. y LASSERRE, J.: Sur le processus histologique des radio-epithelites. *Ann de Dermat et syph*, 6, 505, 1905.
- DELHERM y LAQUERRIERES *Traite d'electroradiotherapie*. Mason et Cie. Paris, 1939.
- DRESSER, R., RUDE, J. C. y COSMAN, B. J.: The difference between 200 Kv. and supervoltage therapy. *Radiology*, 34, 13, 1940.
- DRURY, H.: Dermatosis caused by roentgen X rays. *Brit. med. Jour.*, 1377, 1896.
- DUBOVSKIY, N. V.: On the question of the comparative mutability of stocks of drosophila of different origins. *C. R. Acad. Soc. U.R.S.S.*, 95, 1935.
- EXNER, F. M. y PACKARD, Ch.: A biological measurement of radium gamma rays, *Radiology*, 25, 186, 1936.
- FAILLA, C.: Theory of the biological action of ionizing radiations cancer. *Prob. Symp.*, 89, 202, 1937.
- GOLDFELDER, A.: Action biologique des rayons de roentgen et du radium sur les tissus normaux et les neoplasmes. *Soc. de Biol.*, 571, 1939.
- GRIFFITH, H. D. y ZIMMER, K. G.: The time intensity-factor in relation to the genetic effects of radiation. *British J. Radiol.*, 1938.
- GUNSSSET y MEYER, J.: Variation de la radiosensibilite de tissu cutane humain et animal. *C. R. Soc. de Biol.*, 58, 1931.
- HARRIS, B. B.: The effects of agency of X rays males upon mutation frequency in drosophila. *Jour. Hered.*, 299, 1929.
- HENSHAW, P. S.: Studies of the effect of R. X. on the time of the first cleavage in some marine invertebrate eggs. *Am. J. Roentgenol Rad. Therapy*, 590, 1932.
- HOLFELDER, M.: *Die Roentgen tiefentherapie*. Georg. Thieme. Leipzig.
- HOLWEEK, F.: Le probleme des quanta en radiobiologie du point de vue physique. *Archiv de l'Institut du Rad. de Paris*.
- HOLWECK y Lacassagne: Action des rayon X sur Polyoma uvella. Determination des cibles correspondant aux principales lesions observees. *Soc. Biol.*, 12, 1931.
- PACKARD, C.: A biological measure of X ray dosage. *Jour. of cancer ressearch*, 282, 1927.
- PACKARD, C.: The relation of wave length to death rate of drosophila eggs. *Jour. Cancer*, 87, 1929, 359, 1930.
- PACKARD, C.: The relation between age and radiosensitivity of drosophila eggs. *Radiology*, 223, 1935.
- PATTERSON, J. T.: The productions of mutations in somatic cells of drosophila by means of X rays. *Jour. exp. Zool.*, 327.
- PATTERSON PARKER y SIEPERS: A system of dosage for cylindrical distributions of radium. *Brit. J. Radiol.*, 467, 1936.
- MEREDITH y STEPHENSONS The calculation of dosage and an additional distribution rule for cylindrical. Volume Implantations with radium. *Brit J. Radiol*, 45, 1945.
- MEREDITH y STEPHENSON: The use of radiographs for dosage control in interstitial gamma ray therapy. *Brit. J. Radiol*, 86, 1945.